

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-155259

(43)Date of publication of application : 28.05.1992

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 33/50

G01N 33/72

(21)Application number : 02-281053

(71)Applicant : FUNAYAMA MASASHI

(22)Date of filing : 18.10.1990

(72)Inventor : CHIBA KAZUYOSHI
FUNAYAMA MASASHI**(54) ASSAY OF SAMPLE APPLYING TECHNIQUE OF AFINITY CHROMATOGRAPHY AND
ASSAY KIT CONSTRUCTED TO IMPLEMENTING THE SAME**

(57)Abstract:

PURPOSE: To achieve an increase in the number of samples to be treated with a simplification of operation by calculating an isolated haptoglobin value using an isolated hemoglobin measuring column or after a total hemoglobin value and a total haptoglobin value are obtained.

CONSTITUTION: An object to be inspected is absorbed and bonded to a carrier, and then is bonded selectively to a laboratory device such as a test tube, bead, microtieplate, magnetic particle with the carrier converted to a solid phase. Then, a functional group is bonded as a spacer with the laboratory apparatus as mentioned above as a matrix and furthermore, a protein A, haptoglobin and the like are bonded as reagents. Subsequently, the object to be inspected is bonded specifically to the reagent and then, determined by an existing method with a sample assay kit for implementing the above operation. In other words, an isolated haptoglobin value is calculated using an isolated hemoglobin measuring column or after a total hemoglobin value and a total heptoglobin value are determined. This achieves an increase in the number of samples to be treated per unit time with a simplification of the operation.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of
rejection][Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection][Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

⑫ 公開特許公報(A) 平4-155259

⑬ Int.Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)5月28日

G 01 N 33/543
33/50
33/543
33/72

A 7906-2 J
R 7055-2 J
N 7055-2 J
Q 7906-2 J
A 7055-2 J

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全8頁)

⑯ 発明の名称 アフィニティークロマトグラフィーの技術を応用した検体の定量方法と、それを実施する為に構成された定量キット

⑰ 特 願 平2-281053

⑱ 出 願 平2(1990)10月18日

⑲ 発 明 者 千 葉 主 喜 福島県福島市渡利八幡町151
⑲ 発 明 者 船 山 政 志 埼玉県大宮市指扇領別所214-1
⑲ 出 願 人 船 山 政 志 埼玉県大宮市指扇領別所214-1

明細書

1. 発明の名称

アフィニティークロマトグラフィーの技術を応用した検体の定量方法と、それを実施する為に構成された、定量キット。

2. 特許請求の範囲

- (1) アフィニティークロマトグラフィー担体に、被検検体を吸着、結合させた後、既知の方法(放射イムノアッセイ法、非放射イムノアッセイ法等)により、被検検体を定量する方法。
- (2) アフィニティークロマトグラフィー担体を固相化した、試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子等の実験器具に被検検体を選択的に結合させ、既知の方法(放射イムノアッセイ法、非放射イムノアッセイ法等)により、被検検体を定量する方法。
- (3) アフィニティークロマトグラフィー担体を、ウェルの側面(底面以外の部分)に固相化したマイクロタイタープレート。

- (4) $-N=CH-(CH_2)_n-CH=N-$ 、 $-CONH-$ 等の官能基を固定化し、その官能基にリガンドを共有結合させた、試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子等の実験器具。
- (5) アフィニティークロマトグラフィー担体を固相化した、試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子等の実験器具。
- (6) 試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子等の実験器具をマトリクスとし、 $-N=CH-(CH_2)_n-CH=N-$ 、 $-CONH-$ 等の官能基(官能基とリガンドが結合すれば官能基の種類に特に制限はない)をスペーサーとして結合させ、更に、プロテインA、ハプトグロビン等をリガンド(リガンドと被検検体が結合すれば、リガンドの種類に特に制限はない)として結合させ、引き続き、被検検体をリガンドに特異的に結合させた後、既知の方法(放射イムノアッセイ法、非放射イムノアッセイ法等)により、検体を定量する方法。
- (7) 試験管、ビーズ、マイクロタイタープレ-

ト、磁性粒子等の実験器具をマトリクスとし、プロテインA、ハプトグロビン等をリガンド(リガンドと被検検体が結合すれば、リガンドの種類に特に制限はない)として結合させ、更に、被検検体をリガンドに特異的に結合させた後、既知の方法(放射イムノアッセイ法、非放射イムノアッセイ法等)により、検体を定量する方法。

- (8)請求項(1)、請求項(2)、請求項(6)及び請求項(7)の実施の為に構成された検体定量キット。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はアフィニティークロマトグラフィーの技術を応用した検体の定量方法と、それを実施する為に構成された検体の定量キットに関する。

即ち、実験器具に官能基を固定化し、更に、その官能基にリガンドを結合させ、続いてそのリガンドに被検検体を結合させた後、既知の方

法により、検体を定量する方法。更に、実験器具に直接リガンドを結合させ、そのリガンドに被検検体を結合させた後、既知の方法により、検体の定量をする方法。更に、アフィニティークロマトグラフィー担体を用いて、被検検体を捕捉した後、既知の方法により、検体を定量する方法に関する。

[従来技術]

本発明は、殆どすべての検体の定量に応用出来るが、遊離ヘモグロビンの定量方法を具体例として説明する。

ハプトグロビン(Hp)は、 α_2 -グロブリンに属する糖タンパクで、溶血により生ずる遊離ヘモグロビンと結合し、複合体を形成する。ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体は、肝実質細胞に運搬され、ヘモグロビンは、ビリルビンに代謝される。しかし、遊離ハプトグロビン量よりも多量の遊離ヘモグロビンが、血中に生じた場合には、遊離ヘモグロビンの一部は、糸球体をろ過し、尿細管上皮細胞に摂取され、グロビン

とヘムに分離される。ヘムは、細胞毒で、急性細管壊死の発症原因となり得る。心臓血管外科の進歩と共に、三弁置換術、補助人工心臓置換等の治療が施行される症例が増加しつつあり、これらの高度医療の施療の際に併発する、高度溶血による溶血性腎障害を防止することは、極めて重要なことである。それ故に、遊離ヘモグロビンの迅速定量法が求められている。

現在、遊離ヘモグロビン値を直接に分画定量する方法は考案されていない。僅かに、

- (1) 総ヘモグロビン値と、総ハプトグロビン値から分別定量する方法。

- (2) 遊離ハプトグロビン測定カラムを用いて半定量する方法

の2通りの方法があるのみである。

[発明が解決しようとする問題点]

本発明の発明者らは、

- (1) アフィニティークロマトグラフィー担体に、被検検体を吸着、結合させた後、既知の方法(放射イムノアッセイ法、非放射イム

ノアッセイ法等)により、被検検体を定量する方法。

- (2) アフィニティークロマトグラフィー担体を固相化した、試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子、等の実験器具に被検検体を選択的に結合させ、既知の方法(放射イムノアッセイ法、非放射イムノアッセイ法等)により、被検検体を定量する方法。
- (3) アフィニティークロマトグラフィー担体を、ウェルの側面(底面以外の部分)に固相化したマイクロタイタープレート。
- (4) $-N=CH-(CH_2)_n-CH=N-$ 、 $-CONH-$ 等の官能基を固定化し、その官能基にリガンドを共有結合させた、試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子等の実験器具。
- (5) アフィニティークロマトグラフィー担体を固相化した、試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子、等の実験器具。
- (6) 試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子、等の実験器具をマトリクス

とし、 $-N=CH-(CH_2)-CH=N-$ 、 $-CONH-$ 等の官能基(官能基とリガンドが結合すれば官能基の種類に特に制限はない)をスペーサーとして結合させ、更に、プロテインA、ハプトグロビン等をリガンド(リガンドと被検検体が結合すれば、リガンドの種類に特に制限はない)として結合させ、引き続き、被検検体をリガンドに特異的に結合させた後、既知の方法(放射イムノアッセイ法、非放射イムノアッセイ法等)により、検体を定量する方法。

- (7) 試験管、ビーズ、マイクロタイタープレート、磁性粒子、等の実験器具をマトリクスとし、プロテインA、ハプトグロビン等をリガンド(リガンドと被検検体が結合すれば、リガンドの種類に特に制限はない)として結合させ、更に、被検検体をリガンドに特異的に結合させた後、既知の方法(放射イムノアッセイ法、非放射イムノアッセイ法等)により、検体を定量する方法。

の提供が可能となる。

- (4) 検体が尿でその鮮度が落ち、ヘモグロビンが、還元ヘモグロビン、メトヘモグロビン、ヘマチンに変化し、色調が暗褐色に変化した場合、ハプトグロビンを固体化したアフィニティークロマトグラフィー担体に遊離ヘモグロビンを選択的に結合させ、続いて、酵素免疫測定法により定量する方法(実施例2)は、吸着されている遊離ヘモグロビンが変性している為、正確な値が得られない。これに対し、アフィニティークロマトグラフィー担体またはリガンドに遊離ヘモグロビンを選択的に吸着し、テトラメチルベンジジン法、または、フルオレイン法により定量する方法(実施例1、実施例3)は、遊離ヘモグロビンが変化しても、そのパーオキシダーゼ様活性には、殆ど低下が認められない為、より正確な値が得られる。
- (5) 便潜血反応試験は、酵素免疫測定法によ

- (8) 請求項(1)、請求項(2)、請求項(6)及び請求項(7)の実施の為に構成された検体定量キット。

が既知の方法、即ち、遊離ヘモグロビン測定カラムを用いて半定量する方法および簡易分別定量法の改良、自動化を可能にすることを見出した。

[発明の効果]

即ち、本発明を応用することにより、

- (1) 遊離ヘモグロビン測定カラムを用いた、遊離ヘモグロビン半定量法の煩雑な操作が簡略化でき、単位時間当たりの処理検体数の、飛躍的な増大が期待できる。
- (2) 総ヘモグロビン値と総ハプトグロビン値を求めた後、計算により遊離ハプトグロビン値を算出する、簡易分別定量法の操作の大幅な簡略化が可能となる。
- (3) 高価なアフィニティークロマトグラフィー担体の使用量を減少させることにより、安価な遊離ヘモグロビン分画定量キット

り行なわなければ、便中のヘム様物質、パーオキシダーゼ様活性を持つ物質による影響を除けないという問題があった。しかし、アフィニティークロマトグラフィー担体、またはリガンドに遊離ヘモグロビンを選択的に吸着し、テトラメチルベンジジン法、または、フルオレイン法により定量する方法(実施例1、実施例3)により、便潜血反応試験を行なえば、これらの物質による影響を除去でき、迅速に、安価な検査費用で、便潜血反応の実施が可能となる。

- (6) (a) アフィニティークロマトグラフィー担体に被検検体を結合させた後、既知の方法により、被検検体の定量を行なう方法。
- (b) 担体に官能基を介してリガンドを結合させ、そのリガンドに被検検体を結合させた後、既知の方法により、被検検体の定量を行なう方法。

は共に、従来法に比較し、検体の捕獲量が飛躍的に増大することから、検量線がシグモイド曲線にはならず、直線に近づく為、より正確な値が得られやすい。

という特長がある。

以下に実施例を挙げて、本発明を更に詳細に説明する。

実施例1.

A. キット内容

- (1) 官能基 $-N=CH-(CH_2)_9-CH=N-$ を結合させ、更に、リガンドとしてハプトグロビンを共有結合させたマイクロタイタープレート。
- (2) 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン水溶液。
- (3) 過酸化水素水溶液。
- (4) 標準ヒトヘモグロビン。
- (5) 緩衝液。
- (6) 洗浄液。
- (7) 反応停止液。

B. 測定操作

- (1) 検体を緩衝液で希釈し、キット(1)のマイ

その官能基に、ハプトグロビンを共有結合させた、マイクロタイタープレート

- (2) 酵素標識抗ヒトヘモグロビン抗体。
- (3) 酵素標識抗体溶解液。
- (4) 標準ヒトヘモグロビン。
- (5) 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン水溶液。
- (6) 過酸化水素水溶液。
- (7) 緩衝液。
- (8) 洗浄液。
- (9) 反応停止液。

B. 測定操作

- (1) 検体を緩衝液で希釈し、キットの(1)のマイクロタイタープレートの各穴に 200 μ l ずつ分取した。
- (2) (1)の操作をしたマイクロタイタープレートにシールをし、室温で 30 分インキュベートした。
- (3) マイクロタイタープレートの各穴の内容液を捨て、洗浄液 300 μ l で3回洗浄し

クロタイタープレートの各穴に 200 μ l ずつ分取した。

- (2) (1)の操作をしたマイクロタイタープレートにシールをし、室温で 30 分インキュベートした。
- (3) マイクロタイタープレートの各穴の内容液を捨て、洗浄液 300 μ l で3回洗浄した。
- (4) (3)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴にキットの(2)と(3)の等量混合液 200 μ l を添加、混和し、37 度で 10 分間インキュベートした。
- (5) (4)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に反応停止液 100 μ l を添加し、450 nm の吸光度を測定した。
- (6) 標準ヒトヘモグロビンを用いて同一操作をして描いた検量線から、検体の遊離ヘモグロビン量を求めた。

実施例2.

A. キット内容

- (1) 官能基 $-N=CH-(CH_2)_9-CH=N-$ を固定化し、

た。

- (4) (3)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に酵素標識抗体 200 μ l を添加し、37 度で1時間インキュベートした。
- (5) マイクロタイタープレートの各穴の内容液を捨て、各穴を洗浄液 300 μ l で3回洗浄した。
- (6) (5)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴にキットの(5)と(6)の等量混合液 200 μ l を添加、混和し、37 度で 10 分間 インキュベートした。
- (7) (6)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に反応停止液 100 μ l を添加し、492 nm の吸光度を測定した。
- (8) 標準ヒトヘモグロビンを用いて同一操作をして描いた検量線から検体の遊離ヘモグロビン値を求めた。

実施例3.

A. キット内容

- (1) 官能基 $-CONH-$ を介して、ハプトグロビ

ンを共有結合させた試験管。

- (2) 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン水溶液。
- (3) 過酸化水素水溶液。
- (4) 標準ヒトヘモグロビン。
- (5) 緩衝液。
- (6) 洗浄液
- (7) 反応停止液。

B. 測定操作

- (1) 検体を緩衝液で希釈し、キットの(1)の試験管に 2 ml ずつ分取した。
- (2) (1)の操作をした試験管を室温で 30 分間インキュベートした。
- (3) (2)の操作をした試験管の内容液を捨て、洗浄液 2 ml で3回洗浄した。
- (4) (3)の操作をした各試験管にキットの(2)と(3)の等量混液 2 ml を添加、混和し、37 度で 10 分間インキュベートした。
- (5) (4)の操作をした各試験管に反応停止液 1 ml を添加、混和し、450 nm の吸光度

間インキュベートした。

- (3) (2)の操作をした試験管の内容液を捨て、洗浄液 2 ml で3回洗浄した。
- (4) (3)の操作をした各試験管に酵素標識抗体 2 ml を添加し、37 度で1時間インキュベートした。
- (5) (4)の操作をした各試験管の内容を捨て、各試験管を洗浄液 2 ml で洗浄した。
- (6) (5)の操作をした各試験管に、酵素基質液 2 ml を添加、混和し、37 度で1時間インキュベートした。
- (7) (6)の操作をした各試験管に、反応停止液 1 ml を添加し、492 nm の吸光度を測定した。
- (8) 標準ヒトヘモグロビンを用いて同一操作をして描いた検量線から検体の遊離ヘモグロビン値を求めた。

実施例 5.

A. キット内容

- (1) ハプトグロビンを固定化したアフィニティ

を測定した。

- (8) 標準ヒトヘモグロビンを用いて同一操作をして描いた検量線から検体の遊離ヘモグロビン値を求めた。

実施例 4.

A. キット内容

- (1) ハプトグロビンを固定化したアフィニティークロマトグラフィー担体を固相化した試験管。
- (2) 酵素標識抗ヒトヘモグロビン抗体。
- (3) 酵素標識抗体溶解液。
- (4) 標準ヒトヘモグロビン。
- (5) 酵素基質。
- (6) 緩衝液。
- (7) 洗浄液。
- (8) 反応停止液。

B. 測定操作

- (1) 検体を緩衝液で希釈し、キットの(1)の試験管に 2 ml ずつ分取した。
- (2) (1)の操作をした試験管を室温で 30 分

間インキュベートした。

- (3) (2)の操作をした試験管の内容液を捨て、洗浄液 2 ml で3回洗浄した。
- (4) (3)の操作をした各試験管に酵素標識抗体 2 ml を添加し、37 度で1時間インキュベートした。
- (5) (4)の操作をした各試験管の内容を捨て、各試験管を洗浄液 2 ml で洗浄した。
- (6) (5)の操作をした各試験管に、酵素基質液 2 ml を添加、混和し、37 度で1時間インキュベートした。
- (7) (6)の操作をした各試験管に、反応停止液 1 ml を添加し、492 nm の吸光度を測定した。
- (8) 標準ヒトヘモグロビンを用いて同一操作をして描いた検量線から検体の遊離ヘモグロビン値を求めた。

B. 測定操作

- (1) 検体を緩衝液で希釈し、その 50 μ l を試験管に秤取し、更に、キットの(1)の担体懸濁液 50 μ l を秤取、混和した。
- (2) (1)の操作をした試験管を室温で 30 分間インキュベートした。
- (3) (2)の操作をした試験管中の担体を洗浄液 2 ml で3回洗浄した。
- (4) (3)の操作をした各試験管にキットの(2)と(3)の等量混液 2 ml を添加、混和し、37 度で 10 分間インキュベートした(混和後、3 分後、8 分後に、更に、混和

した)。

- (5) (4)の操作をした各試験管に反応停止液 1 ml を添加、混和し、3,000 rpm で、10 分間遠心分離した後、その上清の 450 nm の吸光度を測定した。
- (6) 標準ヒトヘモグロビンを用いて同一操作をして描いた検量線から検体の遊離ヘモグロビン値を求めた。

実施例6.

A. キット内容

- (1) 官能基 $-CONH-$ を介して、ハプトグロビンを共有結合させたビーズ。
- (2) 3, 3', 5, 5'-тетрамethylбензидин水溶液。
- (3) 過酸化水素水溶液。
- (4) 標準ヒトヘモグロビン。
- (5) 緩衝液。
- (6) 洗浄液。
- (7) 反応停止液。

B. 測定操作

ハプトグロビンを共有結合させたビーズ。

- (2) 酵素標識抗ヒトヘモグロビン抗体。
- (3) 酵素標識抗体溶解液。
- (4) 標準ヒトヘモグロビン。
- (5) 酵素基質。
- (6) 緩衝液。
- (7) 洗浄液。
- (8) 反応停止液。

B. 測定操作

全自動分析装置を用いて、以下のフローチャートに従い、遊離ヘモグロビンの定量を行った。

【フローチャート】

- (1) スタート
- (2) 検体サンプリング
- (3) 緩衝液分注
- (4) ビーズ投入
- (5) 攪拌
- (6) インキュベーション
- (7) ビーズ洗浄

- (1) 検体を緩衝液で希釈し、その 2 ml を試験管に秤取し、更に、キットの(1)のビーズ 1 個を秤取、混和した。
- (2) (1)の操作をした試験管に蓋をし、室温で30分インキュベートした。
- (3) 各試験管の内容液を捨て、洗浄液 2 ml で3回洗浄した。
- (4) 新しく準備した各試験管にキットの(2)と(3)の等量混液 2 ml を添加、混和し、(3)の操作をしたビーズを入れ、37度で10分間インキュベートした。
- (5) (4)の操作をした各試験管に反応停止液 1 ml を添加し、450 nm の吸光度を測定した。
- (6) 標準ヒトヘモグロビンを用いて同一操作をして描いた検量線から検体の遊離ヘモグロビン値を求めた。

実施例7.

A. キット内容

- (1) 官能基 $-N=CH-(CH_2)_3-CH=N-$ を介して、
- (8) 酵素標識抗体分注
- (9) 攪拌
- (10) インキュベーション
- (11) ビーズ洗浄
- (12) ビーズトランス
- (13) 酵素基質分注
- (14) 攪拌
- (15) インキュベーション
- (16) 反応停止液分注
- (17) 測光、データ処理

実施例8.

A. キット内容

- (1) 官能基 $-N=CH-(CH_2)_3-CH=N-$ を結合させ、更に、リガンドとしてハプトグロビンを共有結合させたマイクロタイタープレート。
- (2) フルオレイン水溶液。
- (3) 過酸化水素水溶液。
- (4) 標準ヒトヘモグロビン。
- (5) 緩衝液。
- (6) 洗浄液。

(7) 反応停止液。

B. 測定操作

- (1) 検体を緩衝液で希釈し、キット(1)のマイクロタイタープレートの各穴に 200 μ l ずつ分取した。
- (2) (1)の操作をしたマイクロタイタープレートにシールをし、室温で 30 分インキュベートした。
- (3) マイクロタイタープレートの各穴の内容液を捨て、洗浄液 300 μ l で3回洗浄した。
- (4) (3)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴にキットの(2)と(3)の等量混合液 200 μ l を添加、混和し、37 度で 10 分間インキュベートした。
- (5) (4)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に反応停止液 100 μ l を添加し、450 nm の吸光度を測定した。
- (6) 標準ヒトヘモグロビンを用いて同一操作をして描いた検量線から、検体の遊離ヘ

モグロビン量を求めた。

実施例9.

A. キット内容

- (1) 官能基 $-N=CH-(CH_2)_3-CH=N-$ を固定化し、その官能基に、プロテインAを共有結合させた、マイクロタイタープレート
- (2) 官能基 $-N=CH-(CH_2)_3-CH=N-$ を固定化し、その官能基に、プロテインGを共有結合させた、マイクロタイタープレート
- (3) 酵素標識抗ヒトIgG₃抗体。
- (4) 酵素標識抗体溶解液。
- (5) 標準ヒトIgG₃。
- (6) 酵素基質。
- (7) 緩衝液。
- (8) 洗浄液。
- (9) 反応停止液。

B. 測定操作

- (1) 検体を緩衝液で希釈し、キットの(1)のマイクロタイタープレートの各穴に 200 μ l ずつ分取した。

- (2) (1)の操作をしたマイクロタイタープレートにシールをし、室温で 30 分インキュベートした。
- (3) (2)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴の内容液 190 μ lをキットの(2)のマイクロタイタープレートに移し、シールをし、室温で 30 分インキュベートした。
- (4) マイクロタイタープレートの各穴の内容液を捨て、洗浄液 300 μ l で3回洗浄した。
- (5) (4)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に酵素標識抗ヒトIgG₃抗体 200 μ l を添加し、37 度で1時間インキュベートした。
- (6) マイクロタイタープレートの各穴の内容液を捨て、各穴を洗浄液 300 μ l で 3 回洗浄した。
- (7) (6)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に、酵素基質液 200 μ l を添

加、混和し、37 度で1時間インキュベートした。

- (8) (7)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に反応停止液 100 μ l を添加し、492 nm の吸光度を測定した。
- (9) 標準ヒトIgG₃を用いて同一操作をして描いた検量線から検体のIgG₃値を求めた。

実施例10.

A. キット内容

- (1) 官能基 $-CONH-$ を固定化したマイクロタイタープレート
- (2) 酵素標識抗トロンボキサンB₂抗体。
- (3) 酵素標識抗体溶解液。
- (4) 標準トロンボキサンB₂。
- (5) 酵素基質。
- (6) 緩衝液。
- (7) 洗浄液。
- (8) 反応停止液。

B. 測定操作

- (1) Powell の方法により抽出した粗抽出液

- を、キットの(1)のマイクロタイタープレートの各穴に 200 μ l ずつ分取した。
- (2) (1)の操作をしたマイクロタイタープレートにシールをし、室温で 30 分インキュベートした。
- (3) マイクロタイタープレートの各穴の内容液を捨て、洗浄液 300 μ l で3回洗浄した。
- (4) (3)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に酵素標識抗トロンボキサン B₂抗体 200 μ l を添加し、37 度で1時間インキュベートした。
- (5) マイクロタイタープレートの各穴の内容液を捨て、各穴を洗浄液 300 μ l で 3 回洗浄した。
- (6) (5)の操作をしたマイクロタイタープレートの各穴に、酵基質液 200 μ l を添加、混和し、37 度で1時間インキュベートした。
- (7) (8)の操作をしたマイクロタイタープレート

- の各穴に反応停止液 100 μ l を添加し、492 nm の吸光度を測定した。
- (8) 標準トロンボキサン B₂を用いて同一操作をして描いた検量線から検体のトロンボキサン B₂値を求めた。

以下余白。